

# Regulation of thrombin generation at the surfaces of adherent platelets

Citation for published version (APA):

Briedé, J. J. (2001). *Regulation of thrombin generation at the surfaces of adherent platelets*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.  
<https://doi.org/10.26481/dis.20011116jb>

## Document status and date:

Published: 01/01/2001

## DOI:

[10.26481/dis.20011116jb](https://doi.org/10.26481/dis.20011116jb)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## **Chapter 7**

### **Nederlandse Samenvatting**

## Inleiding: De bloedstolling en de rol van bloedplaatjes

Bij mensen circuleert het bloed in een gesloten systeem van bloedvaten om zo de weefsels en organen te voorzien van voedingsstoffen en om de gevormde afvalstoffen weer weg te voeren. Bloed kan worden onderverdeeld in twee fracties: Een cellulaire fractie bevattende de verschillende bloedcellen en een plasmafractie waarin zich onder andere de oplosbare eiwitten bevinden. De cellulaire fractie bestaat uit drie verschillende type cellen, namelijk de rode cellen (erythrocyten), die verantwoordelijk zijn voor het zuurstoftransport, de witte cellen (leukocyten), die een belangrijke rol spelen in de afweerreactie. Wanneer een bloedvat beschadigt raakt dan spelen de bloedplaatjes (trombocyten), eigenlijk celfragmenten zonder kern, een hoofdrol in het proces dat optreedt na lekkage van het bloedvatstelsel: De bloedstolling. Het stollen van bloed is een nauw gereguleerd en gelokaliseerd proces waarin de bloedplaatjes en bloedeiwitten nauw samenwerken om zo de stolling te beperken tot de plaats van lekkage.

De bloedstolling wordt in gang gezet als door beschadiging de laag van endotheelcellen, die de binnenbekleding van de bloedvaten vormen, verdwijnen en het onderliggende subendotheel aan het bloed wordt blootgesteld. Bloedplaatjes bezitten op hun plasmamembraan allerlei specifieke receptoren die interacties aangaan met de verschillende matrixeiwitten die zich in subendotheliale laag bevinden. De adhesie van bloedplaatjes aan matrixeiwitten als bijvoorbeeld van Willebrand factor (vWf) en collageen heeft als gevolg dat de plaatjes geactiveerd worden. Andere bloedplaatjes zullen vastplakken aan deze initieel geadhereerde en geactiveerde bloedplaatjes, zodat een plaatjesaggregaat (de primaire hemostatische plug) wordt gevormd. Bij dit plakken van bloedplaatjes functioneren plasma-eiwitten zoals vWf en fibrinogeen als de plakeiwitten in plaatjesaggregatie.

Ook wordt op de plek van vaatwandbeschadiging een reeks enzymatische reacties, de stollingscascade, in gang gezet met het ultieme doel de omzetting van oplosbaar fibrinogeen in een polymeer netwerk van fibrinedraden dat de primaire hemostatische plug verder verstevigt. De reeks aan enzymreacties die plaatsvinden in de stollingscascade hebben een aantal gemeenschappelijke kenmerken. Zo wordt telkens een celmembraan-geassocieerd complex gevormd bestaande uit een serine protease samen met zijn cofactor. Zowel enzym als cofactor komen in niet-actieve vorm voor en dienen geactiveerd te worden, waarbij het complex zorgdraagt voor de activering van het enzym dat betrokken is bij de volgende stap in de reeks van enzymreacties. Enkel indien het enzym zich bevindt in een membraan-gebonden complex met zijn cofactor leidt dit tot efficiënte en ook gelocaliseerde activering van zijn substraat.

De stollingscascade begint als weefsel factor (tissue factor, TF) dat zich onder andere in de vaatwand bevindt, wordt blootgesteld aan het voorbijstromende bloed.

Binding van het niet actieve plasma-eiwit factor VII aan TF heeft tot gevolg dat deze geactiveerd wordt tot de serine protease factor VIIa. Dit TF:factor VIIa complex activeert factor X en factor IX. Factor IXa in complex met de cofactor factor VIIIa (het tenase complex) activeert eveneens factor X. Factor Xa vormt op zijn beurt een complex met zijn cofactor factor Va (het protrombinase complex). Dit protrombinase complex zet protrombine om in trombine. Eén van de belangrijkste activiteiten van dit centrale enzym in de bloedstolling is dat het fibrinogeen omzet in fibrinedraden. Daarnaast kan trombine binden aan verschillende receptoren op het plasmamembraan van bloedplaatjes en deze activeren.

Om de vorming van trombine te reguleren spelen een aantal trombine-activiteit en trombine-vorming remmende enzymen een belangrijke rol. Zo activeert trombine zelf het protein C systeem. Geactiveerd protein C (APC) samen met de cofactor protein S vormt ook een membraan-geassocieerd complex dat in staat is via gelimiteerde proteolyse van de cofactoren VIIIa en Va de verdere vorming van trombine af te remmen.

Het plasmamembraan van geactiveerde bloedplaatjes functioneert als platform voor de assemblage van de bij de bloedstolling betrokken enzymcomplexen en zo hun werking optimaliseerd en lokaliseerd. Met name als dit membraan de asymmetrische verdeling van fosfolipiden over binnenste en buitenste laag verliest en het negatief geladen fosfolipid fosfatidylserine (PS) verschijnt in de buitenste monolaag. Voor het in dit proefschrift beschreven onderzoek is gebruik gemaakt van de eigenschap van het eiwit annexine V dat specifiek bindt aan PS-exposerende membranen.

## Doel van het onderzoek

Het doel van de studies beschreven in dit proefschrift was het bestuderen van de regulatie van trombinevorming aan het oppervlak van geadhereerde bloedplaatjes onder goed gedefinieerde stromingscondities. Daarvoor is gebruik gemaakt van de binding van bloedplaatjes aan geïmmobiliseerde eiwitten in de afwezigheid van andere bloedcellen en plasma-eiwitten, zodat ook de invloed van de matrixeiwitten zelf en plasma-eiwitten op de de activering van bloedplaatjes, het verlies van de fosfolipiden-asymmetrie en de regulatie van trombinevorming onderzocht konden worden.

## Procoagulante respons van fibrinogeen- en collageen geadhereerde bloedplaatjes

In **hoofdstuk 2** zijn de gevolgen van de adhesie van bloedplaatjes aan geïmmobiliseerd fibrinogeen beschreven, toegespitst op de veranderingen in morfologie en inclusief de vorming van microvesicles, de relatie met calcium-geïnduceerde plaatjesactivatie en PS-expositie. Niet-geactiveerde bloedplaatjes in de afwezigheid van extracellulair calcium adheren aan geïmmobiliseerd fibrinogeen. Er konden twee morfologisch verschillende populaties van geadhereerde bloedplaatjes worden onderscheiden; waar namelijk de meerderheid volledig gespreid was, bleef ongeveer 10% in een niet-gespreide, dendritische vorm. De cytosolische calcium concentratie ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in de geadhereerde bloedplaatjes was even laag als die van niet-geactiveerde bloedplaatjes (50 nmol/l). Omdat voor de binding van annexine V de aanwezigheid van extracellulair calcium vereist is, is de vraag of fibrinogeen-gebonden bloedplaatjes PS exposeren in afwezigheid van extracellulair calcium beantwoord door proeven te doen met de calcium-influx blokker econazole. Dit leerde ons dat geen van deze bloedplaatjes PS exposeerden. Echter in aanwezigheid van extracellulair calcium exposeerden 1% van de geadhereerde bloedplaatjes PS, gemedieerd door extracellulaire calcium influx en samengaan met de vorming van microvesicles. Versnelling van de calcium influx en PS expositie via een ionomycine behandeling leidde in dendritische plaatjes tot een verandering in een ballonvormige morfologie met een diameter van  $2.0 \pm 0.7 \mu m$  maar zonder verdere microvesicle formatie. In gespreide plaatjes leidde deze behandeling wel tot microvesicle formatie. Via inhibitie van de calpain activiteit werd duidelijk dat een destructie van het cytoskelet betrokken is bij de verandering in de ballonvormige morfologie en microvesicle formatie maar niet bij PS expositie. De plaatjes met een ballonvormige morfologie vertoonden een sterk heterogene verdeling van de annexine V bindingsplaatsen. Niet-geactiveerde bloedplaatjes in afwezigheid van extracellulair calcium binden ook aan geïmmobiliseerd collageen (**hoofdstuk 3**). Echter nu leidt de toevoeging van extracellulair calcium direct tot de verandering in de ballonvormige morfologie en het verschijnen van PS in de buitenste laag van het plasmamembraan. De verschillen in PS expositie van geïmmobiliseerd fibrinogeen- en collageen-gebonden plaatjes is een gevolg van de verschillende signaaltransductie opgewekt door de binding van adhesie receptoren aan hun verschillende liganden. Binding van GP IIb/IIIa aan geïmmobiliseerd fibrinogeen leidt tot spreiding, maar niet tot PS expositie. Bloedplaatjes binden aan geïmmobiliseerd collageen via de GP IaIIa en GP VI receptor en resulteert in het verschijnen van PS in de buitenste laag van het plasmamembraan.

## **Relatie tussen PS expositie en trombinegeneratie aan het oppervlak van fibrinogeen- en collageen-geadhereerde plaatjes onder stromingscondities**

In **hoofdstuk 3** zijn de verschillen in trombinegeneratie aan het oppervlak tussen fibrinogeen- en collageen-geadhereerde plaatjes onder stromingscondities onderzocht. De perfusie van fibrinogeen- of collageen-gebonden bloedplaatjes met factor Xa en protrombine resulteerde in trombinegeneratie die 1) lineair toeneemt gedurende de eerste perfusie minuten en 2) deze lineaire toename was ongeveer twee maal keer sneller op collageen-geadhereerde plaatjes vergeleken met fibrinogeen-geadhereerde bloedplaatjes en 3) vond voor meer dan 98% plaats aan het oppervlak van geadhereerde plaatjes. De lagere trombinegenererende capaciteit van fibrinogeen-gebonden plaatjes is niet zozeer het gevolg van de lagere PS-dichtheid, maar door een lagere concentratie van plaatjes gebonden factor Va. Trombinegeneratie kan namelijk volledig geremd worden door antilichamen gericht tegen humaan factor Va en in aanwezigheid van een overmaat plasma factor Va werden gelijke initiële snelheden van trombinevorming gevonden op collageen- en fibrinogeen-gebonden bloedplaatjes. PS is dus geen snelheids-limiterende factor als een verzadigde hoeveelheid factor Va aanwezig is. En collageen-gebonden bloedplaatjes expresseren dus zoveel plaatjes factor Va dat trombinegeneratie aan het oppervlak van deze plaatjes onafhankelijk is van de aanwezigheid van plasma factor Va. Ook werd gevonden dat trombine alleen nauwelijks in staat is PS expositie te induceren, een observatie die verder uitgewerkt is in **hoofdstuk 5**.

Verder kan uit **hoofdstuk 3** worden geconcludeerd dat het functionele protrombinase complex geassembleerd op het oppervlak van bloedplaatjes uit niet meer componenten bestaat dan PS, (plaatjes) factor Va, calcium en protrombine. Ondanks dat de aanwezigheid van de factor Xa receptor EPR-1 op het oppervlak van collageen-gebonden en trombine-geactiveerde fibrinogeen-gebonden plaatjes kon worden aangetoond, speelde deze receptor geen rol in de assemblage van het functionele protrombinase complex. Een andere belangrijke observatie in **hoofdstuk 3** is dat bij een zekere protrombinase dichtheid een transport-gelimiteerde situatie ontstaat. De vorming van trombine wordt dan gelimiteerd door het transport van protrombine naar het plaatjes-gebonden protrombinase complex.

## **Remming van bloedplaatjes-geassocieerde trombinegeneratie door APC**

In **hoofdstuk 4** is de kinetiek van plaatjes factor Va-gemedieerde protrombinase activiteit en de remming hiervan door APC aan het oppervlak van collageen-geadhereerde bloedplaatjes onder stromingscondities bestudeerd. De studie is uitgevoerd op collageen-geadhereerde bloedplaatjes aanwezig op een roterende

schijf, maar in afwezigheid van microvesicles. Onder deze omstandigheden werd vastgesteld dat voor het protrombinase complex de hoeveelheid protrombine die nodig is om een half-maximale snelheid van trombinevorming te krijgen ( $K_m$ ) 14 nM bedraagt. In aanwezigheid van APC werd een complete inactivatie van het bloedplaatjes-geassocieerde protrombinase activiteit gevonden met een tweede orde remmingsconstante van  $3.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , welke onafhankelijk was van de protrombine concentratie wanneer deze gevarieerd werd in een breed concentratiebereik rond de  $K_m$ . Was het protrombinase complex geassembleerd op een procoagulant fosfolipiden membraanoppervlak (25 mol% PS en 75 mol% PC), dan werd een ongeveer vergelijkbare tweede orde remmingconstante van  $2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  gevonden. Dus bloedplaatjes factor Va-gemedieerde trombine vorming wordt effectief geremd door APC met een vergelijkbare kinetiek als gevonden wordt voor plasma factor Va-gemedieerde trombinevorming op een procoagulant fosfolipiden oppervlak. Een opmerkelijke observatie was dat de remming van de activiteit van het plaatjes factor Va-gemedieerde protrombinase complex geassembleerd het oppervlak van collageen-geadhereerde bloedplaatjes door APC totaal was. Er werd onder deze omstandigheden geen partiële bescherming tegen inactivatie door APC gevonden wanneer factor Va zich op een bloedplaatjes oppervlak bevond, zoals eerder beschreven was. Een verklaring hiervoor zou de massale aanwezigheid van PS in buitenste laag van het plasmamembraan van geïmmobiliseerd collageen-geadhereerde bloedplaatjes kunnen zijn.

### **De procoagulante activiteit van fibrine-gebonden bloedplaatjes onder stromingscondities**

In **hoofdstuk 5** is de rol van fibrine en fibrine-gebonden eiwitten in bloedplaatjes adhesie en de als gevolg van deze adhesie geïnduceerde veranderingen in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en PS expositie onder lage en hoge afschuifspanning (shear stress) bestudeerd. Eerst is er een methode ontwikkeld om fibrine te vormen vanuit stromend plasma op een TF-gecoat glasoppervlak. Vervolgens werd bij een lage shear stress ( $50 \text{ s}^{-1}$ ) gevonden dat 1) niet-geactiveerde plaatjes binden niet aan fibrine; 2) trombine-geactiveerde plaatjes wel binden aan fibrine, de adhesie onafhankelijk is van fibrine-gebonden vWf, de adhesie resulteert in een verhoging van  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tot  $0,2 \mu\text{M}$  en dat maar 12% van de geadhereerde bloedplaatjes PS exposeren. Onder hoge shear stress condities ( $1000 \text{ s}^{-1}$ ) werd gevonden dat 1) fibrine-gebonden vWf en de plaatjesreceptoren GP Ib en GP IIb/IIIa essentieel zijn voor binding; 2) deze adhesie niet leidt tot een verhoging van  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en 3) trombine-activering, maar niet de activering met de protease receptor-1 (PAR-1) specifieke ligand SFLLRN, leidt tot een 20 maal verhoging van  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en PS

expositie in 85% van de geadhereerde plaatjes. In aanwezigheid van botrocetine werden deze laatste effecten ook onder lage shear stress condities gemeten.

## Conclusies

De studies in dit proefschrift laten zien dat de vorming van een trombus een complex mechanisme is waarin de bloedstromingscondities, bloedplaatjes-vaatwand interacties, plaatjes-plaatjes interacties, plaatjes activatie reacties en de pro- en anticoagulante reacties nauw zijn verstrengeld. De gevolgen hiervan voor ons begrip van trombose en anti-trombotische therapieën zijn nader uitgewerkt in **hoofdstuk 7**.